

早稲田大学大学院 先進理工学研究科

# 博 士 論 文 概 要

## 論 文 題 目

細胞質内ウイルス感染センサーRLR の  
シグナル伝達機構に関する研究

A Study of signal transduction of  
intracellular viral RNA sensor RLR

申 請 者

尾野本	浩司
Koji	ONOMOTO

生命理工学専攻 生体制御研究

2011 年 12 月

近代医療の進歩によってガンや糖尿病などの生活習慣病の新たな治療法が次々と開発されていく一方で、世界最大死因の1つは有史以前から続くウイルスや細菌などの病原体による感染症である。現在も HIV, SARS, 新型インフルエンザなど多種多様なウイルスが日々出現してきており、我々は絶えず進化し続けていく新興ウイルス感染症の恐怖に曝されながら生活を送っている。このウイルス感染症に対する防御機構として、高等脊椎動物には自然免疫と獲得免疫という2種類の免疫機能が備わっている。T細胞やB細胞などによる抗原特異的な獲得免疫は非常に強力であるが、感染やワクチン接種などにより抗原を記憶することで後天的に獲得する免疫機構である。一方の自然免疫は、植物から哺乳類まで幅広く存在し、生体が先天的に持つ免疫機構である。また発動までに1週間以上の時間を要する獲得免疫とは異なり、自然免疫は生体内への病原体の侵入を認識後、数時間以内に発動するため、様々なウイルスに対する第一の防御壁として機能している。

脊椎動物の自然免疫で中心的な役割を担っているのが interferon (IFN) である。現在 IFN は一次構造や作用するレセプターの違いから I~III 型までに分類されており、自然免疫では複数の IFN- $\alpha$  と単一の IFN- $\beta$  からなる I 型と IFN- $\lambda$  1~3 からなる III 型 IFN がウイルス感染に伴い一過的に産生・分泌され、細胞に抗ウイルス状態を誘導する。I 型 IFN 産生には ATF/c-jun, IFN regulatory factor (IRF), NF- $\kappa$ B といった複数の転写因子の関与が知られ、なかでも IRF-3/7 が IFN 遺伝子の活性化に深く関わっている。分泌された I 型 IFN は周囲の細胞に発現している IFN 受容体と結合し、様々な IFN 誘導遺伝子群 (IFN-stimulated genes : ISGs) の発現を誘導する。ISGs は細胞にウイルス増殖の阻害、アポトーシスの誘導などの抗ウイルス作用を誘導し、ウイルス感染の拡大を阻止している。

これまで自然免疫は非特異的な免疫応答であると考えられてきたが、近年の研究により、細胞外と細胞質内にそれぞれ病原体関連分子パターンと呼ばれる宿主側にはない病原体特有の成分 (糖、脂質、タンパク質、核酸など) を認識する病原体認識受容体 (pattern recognition receptors : PRRs) が存在することが明らかになった。PRRs の1つである retinoic acid inducible gene-I (RIG-I)-like receptors (RLRs) は、ウイルス由来の非自己 RNA を認識する細胞質内ウイルス RNA センサーであり、ヒトでは RIG-I, MDA5 (melanoma differentiation-associated gene5), LGP2 (laboratory of genetics and physiology 2) の3つの分子からなっている。通常不活性型で存在している RIG-I は、C 末端側の C 末端ドメイン (C-terminal Domain : CTD) によってウイルス RNA を認識し、N 末端側に2回繰り返して持つ caspase recruitment domain (CARD) を露出させ活性型になる。活性化した RIG-I はアダプター分子である Interferon- $\beta$  promoter stimulator-1 (IPS-1) と CARD を介して結合する。IPS-1 は IRF-3/7 などを通して下流へとシグナルを伝達し、I 型 IFN や炎症性サイトカインの産生を誘導する。

RLR の構造解析や新規シグナル伝達因子の同定は盛んに行われているが、一方でウイルス感染時における RLR の局在は殆ど分かっていない。また RIG-I ノックアウトマウスは肝臓発達異常により胎生致死となることが知られており抗ウイルスシグナル以外の機能を持っている可能性が示唆されているが、詳細は殆ど分かっていない。

以上のような背景から、本研究では①RIG-I シグナルの詳細な解析 ②RIG-I の細胞内局在の二つに焦点をあて実験を行った。

① まず、RIG-I によって誘導される遺伝子の発現を解析するため、薬剤依存的なオリゴマー形成誘導の実験系を用いて RIG-I CARD との融合変異体 (FK/RIG) を作製し、オリゴマー形成誘導時の IFN シグナルについて検討を行った。その結果、RIG-I CARD のオリゴマー形成依存的に IRF-3 や NF- $\kappa$ B が活性化され、IFN- $\beta/\alpha 4$  の発現が誘導された。これによりウイルス由来 RNA を介さずに人工的な RIG-I CARD のオリゴマー形成誘導によってシグナルが活性化されることを明らかにした。また本実験系は他の抗ウイルスタンパクからシグナルやウイルスタンパク質による RIG-I 機能阻害の影響を一切受けずに RIG-I からのシグナルのみを検出することが出来る。そこで RIG-I を介して発現が強く誘導される自然免疫関連遺伝子 237 個を選び出し、三菱レイヨン株式会社との共同研究により通常のマイクロアレイよりも安価で短時間で遺伝子発現解析ができる Focused microarray 用の自然免疫チップ (ジェノパール) を作製した。

このマイクロアレイを用いてウイルス感染症の一つである慢性 C 型肝炎の治療効果予測の検討を行った。慢性 C 型肝炎の治療法には、現在 pegylated-IFN とリバビリン併用療法が用いられ HCV1b の患者 50~55% に効果がある。一方で、約半数の患者に対して効果はなく、副作用の発生頻度も高いため、新たな治療法および診断法の開発が望まれている。そこで、慢性 C 型肝炎患者から併用療法前に採取した 87 例の肝生検から抽出した RNA を用いてマイクロアレイ解析を行い、併用療法後に治療効果別に分けた 3 つのグループ (著効 (sustained viral responder : SVR)、再発 (relapse : R)、無効 (non responder : NR)) と正常な肝臓 (normal liver : NL) での遺伝子の発現量を比較した。その結果、NR では IFI27, IFI44, ISG15, MX1, OAS1 の 5 個の ISG の発現量が NL 及び nonNR (SVR+R) に比べ優位に増加していた。さらにこれは併用療法との治療効果予測と 86.1% で一致し、内在性 ISG の発現パターンは C 型肝炎の併用療法の治療効果と密接に関係していることを明らかとした。

次に、ヒトやマウス由来の細胞から樹立した FK、FK/RIG を発現する形質転換株を用いて、RIG-I シグナルによる細胞の形態変化について検討した。その結果、細胞種に関係なく FK/RIG 発現細胞でのみ細胞増殖が抑制された。また IFN やその他のサイトカインで処理しても細胞増殖抑制が観察されないことから、IFN 非

依存的な RIG-I シグナルにより細胞増殖が抑制されていることが明らかとなった。さらに FACS 解析から細胞周期が G1/S 期で停止していることが分かり、G1/S 期の細胞周期を制御している Cdk (cyclin-dependent kinase) inhibitor の 1 つである p21/CIP1 の発現を Western Blotting で調べると RIG-I シグナル依存的に顕著に増加していた。そこで p21/CIP1 欠損細胞の FK/RIG 形質転換株を樹立し、細胞増殖への影響を解析したが、細胞増殖は抑制されなかった。このことから RIG-I を介したシグナルは、IFN 非依存的に p21/CIP1 タンパク質の発現増強を介して細胞周期を抑制していることが明らかとなった。

② 次にウイルス感染時における RLR の局在に焦点をあて研究を行った。まず、RIG-I, MDA5, LGP2 のそれぞれを特異的に認識する抗体を作製し、HeLa 細胞でのウイルス感染時における RLR の局在を RIG-I によって認識されるウイルスである Influenza virus (IAV) と IAV  $\Delta$  NS1(non-structural protein 1 (NS1)欠損株)を用いて調べた。その結果、通常細胞質に広く分布している RLR が IAV  $\Delta$  NS1 感染によって顆粒状に集積していることが明らかとなった。また fluorescence in situ hybridization (FISH)法により IAV のウイルス RNA と RLR が共局在していた。さらに下流のアダプター分子である IPS-1 もシグナルを伝達するため顆粒の周囲に集まっていた。これまでの研究から、細胞はウイルス感染などのストレスを受けると翻訳開始因子である eIF2 $\alpha$ をリン酸化し翻訳を停止させ、細胞質内に RNA と RNA 結合タンパク質などの凝集体(stress granules : SGs)を形成する。そこで IAV  $\Delta$  NS1 感染時に SG マーカータンパク質 (G3BP, TIAR) と RLR との局在を解析すると、ウイルス感染により SG が形成され、SG は RLR と共局在していた。次に RLR の顆粒状の集積と IFN 産生の関係を調べるために、eIF2 $\alpha$ のキナーゼである PKR や SG 構成因子である G3BP の発現を siRNA により抑制し SG 形成が阻害すると、IAV  $\Delta$  NS1 感染時の IFN 産生が顕著に低下した。さらに野生型の IAV では SG 形成されず、NS1 が SG 形成を阻害し IFN 産生を抑制することが明らかとなった。これらの結果からこの顆粒状の集積を antiviral SG (avSG) と命名し、avSG 形成は IAV の RNA を認識し、IFN 産生に必須な役割を担っていることが明らかとなった。

以上、本研究では、まず薬剤依存的に RIG-I を活性化する実験系を確立した。本実験系を用いて自然免疫に特化した Focused microarray を作製し、慢性 C 型肝炎の治療効果予測に重要な遺伝子 5 個を同定した。また RIG-I シグナルには IFN 非依存的に細胞増殖を抑制することを明らかとした。さらにウイルス感染時において RLR が細胞質内に granule 状に集積することを明らかにし、これを avSG と名付けた。avSG は RLR が viral RNA と結合し IFN 産生に必須の場所であることを明らかにした。これらの結果は、感染後の診断だけでなく、ウイルス感染症における新規の抗ウイルス薬の開発への応用を強く期待させるものである。

## 早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

氏名 尾野本 浩司 印

(2012 年 12 月 現在)

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
論文	<p>1. Foreign RNA induces the degradation of mitochondrial antiviral signaling protein (MAVS): the role of intracellular antiviral factors. PLoS ONE 7(9): e45136, 2012 Xing F, Matsumiya T, <b>Onomoto K</b>, Hayakari R, Imaizumi T, Yoshida H, Yoneyama M, Fujita T, Satoh K</p> <p>○ 2. Critical role of an antiviral stress granule containing RIG-I and PKR in viral Detection and Innate Immunity. PLoS ONE 7(8): e43031, 2012 <b>Onomoto K</b>, Jogi M, Yoo J, Narita R, Morimoto S, Takemura A, Sambhara S, Kawaguchi A, Osari S, Nagata K, Matsumiya T, Namiki H, Yoneyama M, Fujita T</p> <p>3. Identification of germicidal compound against picornavirus in bamboo pyroligneous acid. J Agric Food Chem. 60 (36) : 9106-9111, 2012 Marumoto S, Yamamoto SP, Nishimura H, <b>Onomoto K</b>, Yatagai M, Yazaki K, Fujita T, Watanabe T</p> <p>4. Retinoic acid-inducible gene I-inducible miR-23b inhibits infections by minor group rhinoviruses through down-regulation of the very low density lipoprotein receptor. J. Biol. Chem, 286(29):26210-26219, 2011 Ouda R, <b>Onomoto K</b>, Takahasi K, Edwards MR, Kato H, Yoneyama M, Fujita T</p> <p>○ 5. Dysregulation of IFN system can lead to poor response to pegylated interferon and ribavirin therapy in chronic hepatitis C. PLoS ONE, 6(5):e19799, 2011 <b>Onomoto K</b>, Morimoto S, Kawaguchi T, Toyoda H, Tanaka M, Kuroda M, Uno K, Kumada T, Matsuda F, Shimotohno K, Fujita T, Murakami Y</p> <p>6. Virus-infection or 5'ppp-RNA activates antiviral signal through redistribution of IPS-1 mediated by MFN1. PLoS Pathg, 6(7): e1001012, 2010 Onoguchi K, <b>Onomoto K</b>, Takamatsu S, Jogi M, Takemura A, Morimoto S, Julkunen I, Namiki H, Yoneyama M, Fujita T</p>
総説 (英文)	<p>1. Type I interferon production induced by RIG-I-like receptors. J Interferon Cytokine Res. 30(12):875-881, 2010 <b>Onomoto K</b>, Onoguchi K, Takahasi K, Fujita T</p> <p>2. Cytoplasmic recognition of RNA. Adv Drug Deliv Rev. 60(7):841-846, 2008 Yoneyama M, <b>Onomoto K</b>, Fujita T</p> <p>3. Regulation of antiviral innate immune responses by RIG-I family of RNA helicases. Current Topics in Microbiology and Immunology. 316:193-205, 2007 <b>Onomoto K</b>, Yoneyama M, Fujita T</p> <p>4. Triggering antiviral response by RIG-I-related RNA helicases. Biochimie, 89(6-7):754-760, 2007 Fujita T, Onoguchi K, <b>Onomoto K</b>, Hirai R, Yoneyama M</p>

## 早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
(和文)	<p>1. 「抗ウイルス自然免疫分野におけるバイオチップ応用」、『バイオチップ実用化ハンドブック』、エヌ・ティー・エス、p305-311, 2010 <u>尾野本浩司</u>、藤田尚志</p> <p>2. 「ウイルス感染における細胞内センサーの機能解析」、『感染現象 その理解の深化から疾患制御への展望』、蛋白質核酸酵素、Vol.54 No.8、p901-907、2009 <u>尾野本浩司</u>、藤田尚志</p> <p>3. 「ウイルス感染における細胞内センシング機構」、『免疫応答と免疫病態の統合的分子理解』、南山堂、p13-22、2007 <u>尾野本浩司</u>、米山光俊、藤田尚志</p> <p>4. 「ウイルス感染認識と I 型 IFN 発現誘導機構」、『日本臨牀』日本臨牀社、Vol.64 No.7、pp1236-1243、2006 <u>尾野本浩司</u>、米山光俊、藤田尚志</p> <p>5. 「RNA ヘリカーゼ, RIG-I によるインターフェロン系の制御」、『実験医学 増刊号』、羊土社、Vol.23-No.20、pp67 -72、2005 <u>尾野本浩司</u>、米山光俊、藤田尚志</p>
講演	<p>1. Analysis of intracellular localization of viral RNA sensor, RLR. Experimental biology 2011, American Society for Biochemistry and Molecular Biology (ASBMB), Washington DC, 2011 年 4 月 <u>Onomoto K</u>, Yoneyama M, Fujita T.</p> <p>2. Analysis of intracellular localization of viral RNA sensor, RIG-I. 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology、神戸、2010 年 8 月 <u>Onomoto K</u>, Yoneyama M, Fujita T.</p> <p>3. Analysis of intracellular localization of viral RNA sensor, RIG-I. The 5<sup>th</sup> International Symposium of Institute Network、金沢、2010 年 6 月 <u>Onomoto K</u>, Yoneyama M, Fujita T.</p> <p>4. 血球系細胞活性化時における RIG-I シグナルの機能解析 第 75 回 日本インターフェロン・サイトカイン学会、福岡、2010 年 6 月 <u>尾野本浩司</u>、西川千紘、米山光俊、藤田尚志</p> <p>5. Intracellular localization of RIG-I in virus infected cells. 第 39 回 日本免疫学総会、大阪、2009 年 12 月 <u>Onomoto K</u>, Yoneyama M, Fujita T.</p> <p>6. Intracellular localization of RIG-I in virus infected cells. The 9<sup>th</sup> Awaji International Forum On Infection and Immunity、淡路、2009 年 9 月 <u>Onomoto K</u>, Yoneyama M, Fujita T.</p>

## 早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
講演 （続き）	<p>7. ウイルス感染細胞における RIG-I の局在と機能解析 第 74 回 日本インターフェロン・サイトカイン学会、京都、2009 年 6 月 <u>尾野本浩司</u>、米山光俊、藤田尚志</p> <p>8. Signal transduction by oligomerization of RIG-I CARD and its physiological functions. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology: Pattern Recognition Molecules and Immune Sensors of Pathogen, Canada、2009 年 3 月 <u>Onomoto K</u>, Yoneyama M, Fujita T.</p> <p>9. Signal transduction by oligomerization of RIG-I CARD The 15<sup>th</sup> East Asia Joint Symposium on Biomedical Research、韓国、2008 年 7 月 <u>Onomoto K</u>, Yoneyama M, Fujita T.</p> <p>10. RIG-I CARD のオリゴマー形成によるシグナル伝達機構の解析 第 73 回 日本インターフェロン・サイトカイン学会、札幌、2008 年 7 月 <u>尾野本浩司</u>、米山光俊、藤田尚志</p> <p>11. Signal transduction by oligomerization of RIG-I CARD The 14<sup>th</sup> East Asia Joint Symposium on Biomedical Research、東京、2007 年 11 月 <u>Onomoto K</u>, Yoneyama M, Fujita T.</p> <p>12. RIG-I CARD のオリゴマー形成によるシグナル伝達機構と生理的機能の解析 第 72 回 日本インターフェロン・サイトカイン学会、京都、2007 年 7 月 <u>尾野本浩司</u>、米山光俊、大島 宏之、藤田尚志</p> <p>13. RIG-I CARD のオリゴマー形成によるシグナル伝達とその生理機能 分子生物学会 2006 フォーラム、名古屋、2006 年 12 月 <u>尾野本浩司</u>、米山光俊、藤田尚志</p> <p>14. RIG-I CARD のオリゴマー形成によるシグナル伝達誘導の解析 第 71 回日本インターフェロン・サイトカイン学会、神戸、2006 年 7 月 <u>尾野本浩司</u>、米山光俊、藤田尚志</p>
その他 （講演）	<p>1. 高濃度血清により誘導されるマウス・メラノーマ細胞の細胞死と関連遺伝子の解析 第 75 回日本動物学会大会、神戸、2004 年 9 月 <u>尾野本浩司</u>、並木秀男</p>